

論文の内容の要旨

論文題目 英文題目（日本語） Development of predictive method of unbound brain concentration of central nervous system drugs for drug discovery screening（創薬スクリーニングを指向した脳中遊離型薬物濃度予測法の開発）

氏 名 小 平 浩 史

中枢薬の開発において、作用発現部位での薬物濃度と薬効との定量的な関係を明らかにすることは、有効性の高い化合物選択、適切な投与用量や安全域の予測を行うために重要な課題である。中枢神経系内に存在する標的蛋白の阻害や活性化に対して、脳中遊離型薬物濃度は重要な指標となる。一般に脳中遊離型薬物濃度を直接測定する手法は技術的な困難を伴い、かつスループットが高くないことから、創薬段階では、それに代替する推定方法が必要となる。血液から中枢神経系への物質移行は、血液脳関門により制限されているため、血液中遊離型薬物濃度は脳中遊離型薬物濃度の指標にならないことが知られている。その一方で、脳実質と脳脊髄液との間には関門が存在しないことから、一般的に、脳脊髄液中の薬物濃度が脳中の遊離型薬物濃度の指標として利用されている。しかし、脳脊髄液中濃度を脳中遊離型濃度の指標と見なすことができる化合物側の動態特性については、これまで体系的に検討されてこなかった。申請者は中枢薬の開発において、創薬初期段階から適用可能かつ簡便に脳中遊離型濃度を予測するための方法論を開発することを目的として、以下の研究に取り組んだ。

第一章 血液脳関門における P-gp と Bcrp の薬物排出機構の定量的な *in vivo* 解析

P-gp 及び Bcrp は血液脳関門の実体である脳毛細血管内皮細胞の管腔側細胞膜上に発現する。医薬品を能動的に血液中へとくみ出すことで、その中枢移行を制限する。P-gp 強制発現系における *in vitro* 輸送活性と血液脳関門における排出輸送能が相関する P-gp と異なり、Bcrp については *in vitro* からの予測性が低いことが報告されていた。これは一部薬物が Bcrp だけでなく、P-gp によるくみ出しを

受けるためと考えられていた。その後、P-gpとBcrpのダブルノックアウトマウス(Mdr1a/1b(-)/Bcrp(-)マウス)では、両トランスポーターの共通基質の脳内濃度がMdr1a/1b(-)もしくはBcrp(-)マウスと比べても、著しく増大することが明らかにされた。これまでに、P-gpもしくはBcrp欠損における他方のトランスポーターの代償的な発現誘導、もしくは血液脳関門でのP-gpとBcrp間の薬物排出の相乗作用など生化学的機構が提唱されているが、本研究では、血液脳関門におけるP-gp及びBcrpによる排出輸送の寄与率を考慮することで、薬物速度論的に説明できると考えた。

P-gp及びBcrpの薬物排出機構を速度論的に説明するため、血液脳関門透過に関わる4つの膜透過性を考慮して、野生型マウスに対するMdr1a/1b(-)、Bcrp(-)、Mdr1a/1b(-)/Bcrp(-)マウスの脳-血漿濃度比をP-gp、Bcrpによる輸送活性と血液脳関門での単純拡散により表した(図1)。実際に、各ノックアウトマウスを用いて、定常状態下での脳-血漿濃度比を測定した。P-gp及びBcrpの選択的基質であるquinidine及びdantroleneの脳-血漿濃度比は、野生型マウスに比べてそれぞれBcrp(-)及びMdr1a/1b(-)マウスで有意な変化はなかった。よってP-gpもしくはBcrpを欠損させたことによる、他方のトランスポーターの発現変動は、in vivoでの薬物輸送に影響を与えるほど大きいものではないと考えられた。P-gp及びBcrpの共通基質であるerlotinib、flavopiridol、mitoxantroneの脳-血漿濃度比は、野生型及びMdr1a/1b(-)、Bcrp(-)に比べて、Mdr1a/1b(-)/Bcrp(-)マウスにおいて顕著に増加した。この野生型マウスに対する各ノックアウトマウスでの脳-血漿濃度比を図中の式に当てはめ、血液脳関門における総排出輸送に占めるP-gp及びBcrpの寄与率を算出した。いずれの薬物についても、P-gp、Bcrpの輸送活性が単純拡散に比べて大きいことを見いだした。各トランスポーターの寄与率に基づいて実測値を再現できること、ならびに文献報告されている他の薬物においても、同様の手法を適用することで、ダブルノックアウトマウスにおける脳内濃度の増大を定量的に説明できることから、本解析手法は汎用性が高いものと考えている。

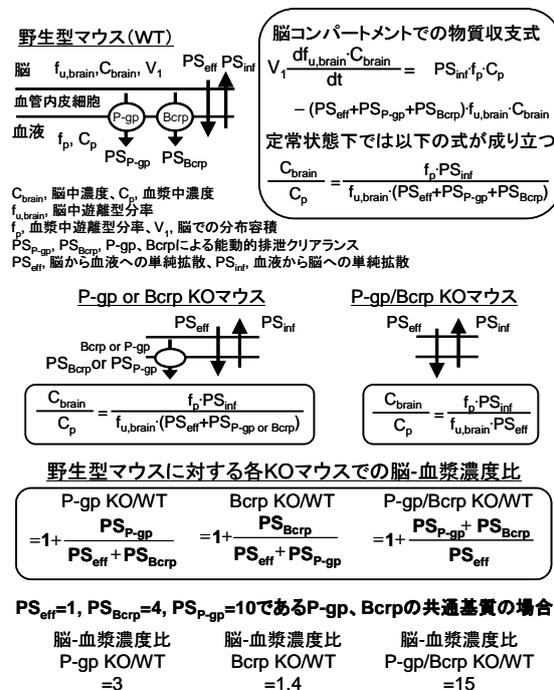


図1 P-gp及びBcrpの薬物排出機構の速度論解析からの説明

第二章 脳脊髄液中薬物濃度が脳中遊離型薬物濃度の指標となるための条件解析と両濃度の乖離の定量的な予測

一般的に、脳脊髄液中薬物濃度は脳中遊離型薬物濃度の指標として使用されている。しかし、どのような体内動態特性を有する薬物の脳脊髄液中濃度が指標になるのか、これまでに体系的な解析は行われていない。また、脳脊髄液中濃度が脳中遊離型濃度の指標となる薬物かどうか創薬初期の段階から判断できるin vitro評価系の構築が望まれている。そこで脳脊髄液と脳の遊離型濃度に乖離を示す薬物の動態特性を明らかにし、中枢薬の開発において創薬初期からin vitroのデータを用いて両薬物

濃度の乖離を定量的に予測できる方法論について検討した。

P-gp 及び Bcrp 基質を含む 25 薬物についてラットに定速静脈内投与後の脳脊髄液-脳中の遊離型濃度比 ($C_{u,CSF}/C_{u,ISF}$) を算出した (図 2)。両濃度に乖離が認められる薬物 ($C_{u,CSF}/C_{u,ISF} > 2$) のほとんどは、P-gp 及び Bcrp の基質であった。そこで、P-gp 及び Bcrp による血液脳関門からの能動的排出が、両濃度の乖離に与える影響を検討するため、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 試験を行った。Bcrp 基質である daidzein 及び genistein、P-gp 基質である

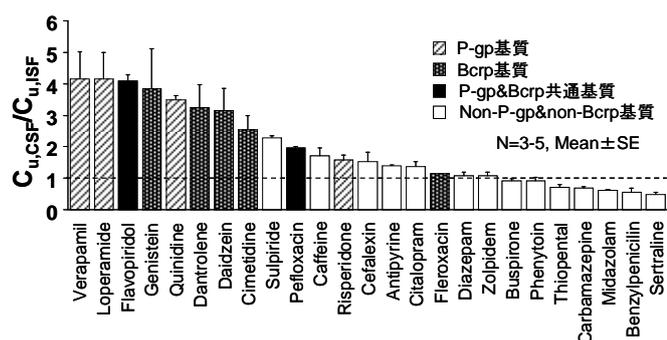


図2 25薬剤のラットでの脳脊髄液-脳中遊離型濃度比

薬物を定速静注し、血漿中濃度、脳中濃度 ($C_{u,brain}$)、脳脊髄液中濃度を測定した。血漿中遊離型分率 (f_u) は平衡透析法により、脳中遊離型分率 ($f_{u,brain}$) は脳スライス法により検討した。脳中遊離型濃度は $C_{u,brain}$ と $f_{u,brain}$ の積から算出した。 $C_{u,CSF}$: 脳脊髄液中遊離型濃度、 $C_{u,ISF}$: 脳中遊離型濃度

quinidine 及び verapamil における両濃度の乖離は、Bcrp(-/-)あるいは Mdr1a/1b(-/-)マウスで消失した。また、共通基質である erlotinib 及び flavopiridol は、P-gp 及び Bcrp の両方を欠損させてはじめて両濃度の乖離が消失した。よって血液脳関門での P-gp 及び Bcrp の能動的排出により、その基質の脳脊髄液と脳中の遊離型濃度に乖離が生じることが明らかとなった。さらに、両濃度の乖離を定量的に予測するため、血液、脳、脳脊髄液コンパートメントから成る数理モデルを構築し、各コンパートメントでの物質収支式から、定常状態時での脳-血漿遊離型濃度比 ($C_{u,ISF}/C_{u,p}$)、脳脊髄液-血漿遊離型濃度比 ($C_{u,CSF}/C_{u,p}$) を算出した。その際に、①血液脳関門と血液脳脊髄液関門での単純拡散が比例関係であること、②脳と脳脊髄液の間は拡散で移行すること、③単純拡散に対する各トランスポーターの輸送活性が *in vitro* 試験と *in vivo* 試験で比例関係であることを仮定した。血液脳関門透過性は、薬物の物性値から 2 つの方法で予測した。各薬物の血液脳関門透過性、P-gp 及び Bcrp 輸送活性を用いて定常状態時の $C_{u,ISF}/C_{u,p}$ 及び $C_{u,CSF}/C_{u,p}$ の式と実測値を非線形最小二乗法により同時に当てはめ計算し、未知パラメータを決定した。分子量と脂溶性から推定した透過性を用いた場合、 $C_{u,CSF}/C_{u,p}$ の genistein 及び loperamide を除いた薬物において、脂溶性と 2 種類の極性表面積から推定した透過性を用いた場合、前述の 2 つの薬物に加えて $C_{u,ISF}/C_{u,p}$ の dantrolene を除いて、3 つの遊離型濃度比の予測値は実測値の 3 倍以内であり、脳脊髄液と脳中の遊離型濃度の乖離を良好に予測できた。一部の P-gp 基質 (CP-141938、NFPS、metoclopramide) では、血液脳関門で能動的なくみ出しを受けるにも関わらず、脳脊髄液と脳中の遊離型濃度の乖離が小さいことが報告されている。今回構築したモデルにより、これらの P-gp 基質の $C_{u,CSF}/C_{u,ISF}$ を予測したところ、実測値と同様に乖離が小さいと予想された。その要因をととして、血液脳脊髄液関門での単純拡散が小さく、脳脊髄液の bulk flow が無視できないことが挙げられる。

以上の結果から、血液脳関門での P-gp 及び Bcrp の能動的な排出が脳脊髄液と脳中の遊離型薬物濃度の乖離を決定する要因であることを明らかにした。また、脳脊髄液と脳中の遊離型薬物濃度の乖離を各薬物の *in vitro* データをもとに定量的に予測するモデルを構築した。

総括

本研究により、P-gp 及び Bcrp の共通基質の脳-血漿濃度比は、BBB での単純拡散に対して、P-gp

及び Bcrp 両トランスポーターの輸送活性が大きいことで説明可能であった。単純拡散、それぞれのトランスポーター輸送活性を *in vitro* で測定することにより、その脳中濃度は予測可能であると考えられた。また、血液脳関門における能動的な排出輸送が大きい薬物では、脳脊髄液と脳中の遊離型薬物濃度の乖離が大きいことを明らかにした。血液中遊離型濃度と血液脳関門における単純拡散、*in vitro* P-gp 及び Bcrp 輸送活性に基づいて、定常状態における脳と脳脊髄液の遊離型濃度を予測する方法論を構築した。本研究で構築したモデルならびに *in vitro* 試験を利用することで、創薬初期において中枢薬の脳脊髄液中濃度が脳中遊離型濃度の指標になるかどうか、前臨床の段階で判断できるものと期待される。